ژنگان‌های ناقص ویروسی: عوامل پیش برنده کلیدی در برهمکنش بین ویروس و میزبان

وحیده حسن زاده*

تهران، دانشگاه تهران، دانشکده زیست شناسی

چکیده

ویروس‌ها اغلب در محیط‌های خشن میزبان زنده می‌مانند اما، با در نظر گرفتن منابع ژنگانی محدود ویروس‌ها، اطلاعات ما درباره تدابیری که آن‌ها برای سازگاری و بقا اتخاذ می‌کنند، ناچیزاست. ما اکنون در آغاز راه برای درک تطبیق پذیری حیرت انگیز ژنگانهای ویروسی هستیم و اینکه چگونه واریانت های ویروسی که به صورت کارآمد یا ناکارآمد تکثیر می‌شوند، می‌توانند روش‌هایی برای سازگاری، فرار از سیستم ایمنی و تداوم ویروس فراهم کنند. این مقاله، دانش کنونی ما را در مورد انواع ژنگانهای ناقص ویروسی که طی تکثیر ویروس‌های RNA دار ایجاد می‌شوند و عملکردهای آن‌ها جمع بندی می‌کند. ما بر عمومیت وتنوع ژنگان‌های ناقص ویروسی در عفونت‌ها تاکید می‌کنیم و درباره نقش پیش بینی شده آن‌ها در حفظ یک جمعیت ویروسی سازگار با محیط میزبان، اثر آن‌ها بر سلامت جانوران و انسان و ظرفیت آن‌ها برای استفاده به عنوان ابزارهای پاد ویروسی بحث می‌کنیم.

واژگاه کلیدی: ذرات زیرویروس، ژنگان های ناقص ویروسی، برهمکنش ویروس – میزبان بیش‌جهش‌ها

مترجم مسئول، پست الکترونیکی: hassanzadeh@khayam.ut.ac.ir

ویروس‌ها میکروارگانیسم‌های بسیارانعطاف پذیری هستند که می‌توانند خود را با محیط پیچیده ایمنی و فیزیولوژیکی میزبان وفق دهند و زنده بمانند. شواهد رو به افزایشی نشان می‌دهد که ویروس‌ها می‌توانند طی تکثیر اشکال تغییر یافته‌ای از ژنگان خود را به عنوان ابزاری برای سازش با چالش‌های محیطی تولید کنند. در حالی که ژنگان استاندارد همه پروتئین‌های لازم برای استمرار تکثیر ویروس را رمزگذاری می‌کند، واریانت‌های ویروسی جهش‌های تصادفی حمل می‌کنند که می‌توانند توانایی ویروس را برای سازش با شرایط جدید افزایش دهند (۱). به علاوه، ژنگان‌های ناقص ویروسی[1] و یک خانواده در حال گسترش از ذرات زیرویروسی[2] (جعبه ۱) که یا از جهش‌های کوچک و یا از کوتاه شدگی‌های اساسی و تغییرات ژنگان ویروسی ناشی می‌شوند، باعث می‌شوند ویروس نتواند در غیاب یک ویروس کمکی کامل، برای جبران عملکردهای از دست رفته، یک چرخه کامل تکثیر را تمام کند.

ژنگان‌های ناقص ویروسی در اواخر دهه چهل میلادی توسط پِربِن وُن مَگنوس[3] به صورت ویروس‌های ناقص آنفلونزایی شناسایی شدند که می‌توانستند در تکثیر ویروس نوع وحشی مداخله کنند (۲). دو دهه پس از کشف آن‌ها، آلیس هوانگ[4] و دیوید بالتیمور[5] نام ذرات ناقص مداخله گر[6] را برای تعریف ذرات ویروسی که پروتئین‌های ساختاری طبیعی دارند اما تنها بخشی از ژنگان ویروسی را حمل می‌کنند، ابداع کردند. به علاوه، آن‌ها تصریح کردند که ذرات ناقص مداخله گر تنها می‌توانند در حضور یک ویروس کمکی تکثیر شوند و آن‌ها در تکثیر ویروس هومولوگ و سالم درون سلول مداخله می‌کنند (۳). هوانگ و بالتیمور معتقد بودند که ذرات ناقص مداخله گر نقش جدی در سوق دادن به سمت بیماری زایی ویروسی ایفا می‌کنند. مطالعات بعدی با استفاده از ذرات ناقص مداخله گر آشکار کرد که این ذرات ویروسی بیماری زایی را درزیوه[7] کاهش می‌دهند (۴، ۵)، طی عفونت در شیشه سطوح بالایی از اینترفرون[8] القا می‌کنند (۸-۶) و به ماندگاری درشیشه (۱۶-۹) و درزیوه ویروس کمک می‌کنند (۱۷، ۱۸). اما، علی رغم حضور فراگیر و عملکردهای مهم این ژنگانهای ناقص، نبود فناوری مناسب برای شناسایی ذرات ناقص مداخله گر در عفونت‌ها درزیوه به این باور عمومی منجر شد که ذرات ناقص مداخله گر و ژنگانهای ناقص ویروسیِ آن‌ها عمدتاً

[1] defective viral genomes (DVGs)
[2] sub-viral particles
[3] Preben Von Magnus

[4] Alice Huang
[5] David Baltimore
[6] defective interfering particles (DIP)
[7] *In vivo*
[8] interferon (IFN)

محصول تکثیر ویروس درشیشه است و به عفونت‌های طبیعی ویروسی مربوط نمی‌شود (۱۹، ۲۰). در اواخر دهه نود میلادی، تحقیق درباره ژنگانهای ناقص ویروسی به شدت کاهش یافت و به استفاده از آن‌ها به عنوان ابزاری جهت مطالعه تکثیر ویروس یا به عنوان پادویروس های بالقوه محدود شد.

امروزه، ژنگان‌های ناقص ویروسی برای اغلب ویروس‌های RNA دار توصیف شده‌اند و پیشرفت‌های فنی در تعیین نقش آن‌ها به عنوان پیام‌های خطر جهت به کار انداختن مصونیت پاد ویروسی در بسیاری از عفونت‌ها سهیم بوده است. به علاوه، ما تازه در آغاز راه برای درک اثر آن‌ها بر پیامدهای بالینی عفونت‌های طبیعی و تکامل ویروس‌ها هستیم. ما همچنین شاهد پیشرفت‌های سریعی در درک سازوکارهای مولکولی هستیم که تولید ژنگانهای ناقص ویروسی را تنظیم می‌کنند و سازوکارهایی که نقش‌های متناقض آن‌ها را در ایجاد مصونیت پادویروسی و ماندگاری ویروس توضیح می‌دهند.

در این مقاله، ما شواهدی را مرور می‌کنیم که پس از افزون بر نیم قرن مطالعه بر روی تولید و فعالیت ژنگانهای ناقص ویروسی هنگام عفونت با ویروس‌های RNA دار جمع آوری شده‌اند و بر پیشرفت‌های جدیدی تاکید می‌کنیم که اثر جدی آن‌ها را بر پویایی و تکامل ویروس طی برهمکنش‌های کوتاه و بلند مدت بین میزبان و ویروس نشان می‌دهد.

دسته‌ها، انواع ، ساختارها و تنوع

انواع متفاوت ژنگانهای ناقص ویروسی با نوع تغییرات ژنگانی تعریف می‌شوند. توالی‌یابی نسل بعد (next generation sequencing) آشکار کرده است که در برخی عفونت‌ها تنوع زیادی از گونه‌های ژنگان ناقص ویروسی وجود دارد و مطالعات جدید به تدریج عملکردهای متمایز این ژنگانهای ناقص ویروسی متفاوت را روشن می‌کنند.

جعبه ۱ – خانواده در حال گسترش ذرات زیر ویروسی (sub-viral particles)

علاوه بر ژنگانهای ناقص ویروسی، تعداد رو به افزایشی از واریانت های ذرات ویروسی و عوامل زیر ویروسی (sub-viral agents) در ویروس‌های گیاهان، بندپایان و پستانداران کشف شده‌اند. این ذرات ویروسی شامل ویروئیدها، ویروس‌های ماهواره‌ای، ویروفاژها و وزیکول‌های شبه ویروسی خارج سلولی (viral-like extracellular vesicles) می‌شود. تعریف این ذرات عمدتاً به دلیل ویژگی‌های مشترک آن‌ها، گاهی مبهم به نظر می‌آید. به طور کلی، عوامل زیرویروسی، مشابه ژنگانهای ناقص ویروسی، برای تکثیر و انتشار به تکمیل با ویروس استاندارد وابسته هستند. اما تفاوت‌ها در نیازمندی‌های آن‌ها برای تکمیل، ویروس هدف و یکسانی توالی با ویروس کمکی‌شان برای زیر طبقه بندی آن‌ها استفاده می‌شود. در اینجا، ما تعریف‌های کنونی از ذرات زیرویروسی را ارائه و بر جنبه‌هایی تاکید می‌کنیم که آن‌ها را از ذرات ناقص مداخله گر و ژنگانهای ناقص آن‌ها متمایز می‌کند.

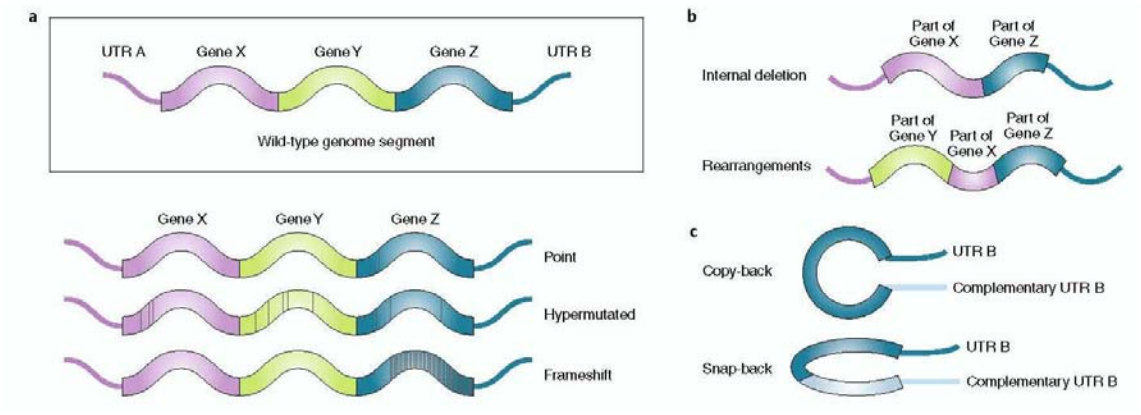
ویروس‌های ماهواره‌ای نخست در ویروس‌های گیاهی به عنوان RNA های خطی یا حلقوی به طول ۱۸۰۰–۲۰۰ نوکلئوتید توصیف شدند که برای انتشار به یک ویروس کمکی نیاز دارند اما در توالی با ویروس کمکی خویشاوند نیستند. ویروس‌های ماهواره‌ای عموماً برای تکثیر ویروس کمکی غیر ضروری هستند (۱۹۲، ۱۹۳). آن‌ها از RNA های ماهواره‌ای متفاوت هستند؛ زیرا یک پروتئین رمزگذاری می‌کنند که RNA ماهواره‌ای را در ویریون‌ها بسته بندی می‌کند. RNA های ماهواره‌ای می‌توانند در تکثیر ویروس کمکی خود مداخله کنند و بیماری را تضعیف یا تشدید کنند. یک مثال از ویروس‌های ماهواره‌ای ویروس نکروز تنباکو (satellite tobacco necrosis virus) است (۱۹۴). این ویروس RNA دار تک رشته‌ای مثبت تکثیر ویروس کمکی خود را سرکوب می‌کند و نشانه‌های ویروس نکروز تنباکو را بهبود می‌بخشد (۱۹۵).

ویروئیدها با ویروس‌های ماهواره‌ای متفاوت هستند چرا که آن‌ها هیچ پروتئینی را رمزگذاری نمی‌کنند، برای تکثیر به ویروس کمکی نیاز ندارند و فاقد کپسید هستند. ویروئیدها یک ژنگان RNA حلقوی به طول ۴۰۰–۲۰۰ نوکلوتید دارند که بسیار مکمل و دارای ساختار است. آن‌ها به گونه‌ای سازش یافته‌اند تا تمام چرخه حیات خود را از طریق برهمکنش با دستگاه سلول میزبان پیش برند (۱۹۶، ۱۹۷).

ویروفاژها ویروس‌های DNA دار دو رشته‌ای به طول ۳۰–۱۵ کیلو باز هستند که به طور طبیعی ذرات بیست وجهی (icosahedral particles) تولید می‌کنند و برای انتشار انگل ویروس‌های DNA دار دو رشته‌ای غول پیکر (giant dsDNA viruses)(می‌می ویروس‌ها (mimiviruses) و سایر ویروس‌ها) می‌شوند. ویروفاژها کارخانه ویروس غول پیکر را آلوده می‌کنند و به ویروس غول پیکر آسیب می‌رسانند (۱۹۸). اولین ویروفاژ کشف شده، به نام اسپوتنیک (Sputnik)، همراه با ماما ویروس اکانتامبا کاستلانی (Acanthamoeba castellanii mamavirus) یافت شد که در انتشار آن مداخله می‌کرد (۱۹۹). چند ویروفاژ دیگر و نیز تعداد زیادی ویروفاژ نامزد از آن زمان تا کنون شناسایی شده‌اند (۱۹۵، ۱۹۸، ۲۰۰). مطالعات جدید نشان می‌دهند که ویروفاژها می‌توانند به ویروس‌های DNA دار واقعی شبیه باشند (۲۰۱) و طبقه بندی مجدد آن‌ها به عنوان یک خانواده ویروسی جدا پیشنهاد شده است (۱۹۵).

وزیکول‌های شبه ویروسی خارج سلولی طی عفونت‌های ویروسی تولید می‌شوند و بر خلاف سایر وزیکول‌های خارج سلولی حاوی پروتئین‌های ویروسی و اسیدهای نوکلئوید هستند اما فاقد پروتئین کپسید یا ژنگانهای ویروسی هستند و در نتیجه عفونی نیستند. این وزیکول‌ها هم در ویروس‌های RNA دار و هم در ویروس‌های DNA دار از جمله ویروس هرپس سیمپلکس ۱(herpes simplex virus-1)، ویروس هپاتیت C یا ویروس هرپس همراه با بیماری سارکوم کاپوسی (Kaposi's sarcoma-associated herpes virus) توصیف شده‌اند. وزیکول‌های شبه ویروسی خارج سلولی با تسهیل ارتباط بین سلول‌ها و افزایش عفونت ویروسی نقش‌های عملکردی طی عفونت‌ها ایفا می‌کنند (۲۰۴–۲۰۲).

جهش‌های نقطه‌ای، بیش‌جهش‌ها (hypermutations) و تغییر چارچوب. در حالی که نخستین ژنگانهای ناقص ویروسی که شناسایی و از ژنگان نوع وحشی ویروس متمایز شدند فاقد بخش‌های بزرگی از ژنگان بودند (۲۵-۲۱)، تعدادی از انواع ژنگان ناقص ویروسی وجود دارد که در آن‌ها تغییرات اساسی ژنگانی دیده نمی‌شود. جهش‌های نقطه‌ای در ویروس‌های RNA دار می‌توانند، به دلیل ماهیت بسیار فشرده سازمان دهی ژنگان آن‌ها، به تغییرات مضر منجرشود. در واقع، عمده جهش‌های تصادفی، یا کشنده هستند و یا، همان طور که برای ویروس استوماتیت وزیکولی (vesicular stomatitis virus (VSV))(۲۶)، ویروس فلج اطفال (۲۷) و ویروس آنفلونزا (۲۸) مشاهده شده است، هزینه برازندگی (fitness cost) زیادی ایجاد می‌کنند. در حالی که طبیعتاً درک شده است که جهش‌های مضر به ایجاد ژنگانهای ناقص منجر می‌شود، از نظر تاریخی، این نوع ژنگانها، ژنگان‌های ناقص ویروسی در نظر گرفته نشدند. ژنگانی که در ژن رمزگذار یک پروتئین ساختاری یک جهش مضر حمل می‌کند می‌تواند همانندسازی کند اما نمی‌تواند به درستی سرهم شود؛ در حالی که یک جهش مضر در آنزیم رپلیکاز، ژنگانی تولید می‌کند که می‌تواند پروتئین‌های ساختاری و سرهم بندی مناسب را بسازد اما نمی‌تواند همانند سازی کند. هر کدام از این ژنگانهای ناقص می‌تواند برای جبران عملکرد از دست رفته خود از عملکردهای یک ویروس کامل که همزمان سلول را آلوده کرده است، استفاده کند و بدین ترتیب در عملکرد ویروس کامل مداخله کند. در واقع، مطالعاتی که در آن‌ها نرخ جهش در یک جمعیت ویروسی از زیست پذیری به غیر زیست پذیری افزایش یافته است، آشکار کرده است که RNA های ناقصی که پیش از نابودی جمعیت ظاهر می‌شوند با همانند سازی ژنگان نوع وحشی ویروس مداخله می‌کنند (۲۹، ۳۰). بیش جهش‌ها و جهش‌هایی که به تغییر چارچوب منجر می‌شوند نیز به ایجاد ویروس‌های ناقص می‌انجامند (۳۱) (شکل 1a). یک مثال مربوط به جهش‌هایی است که توسط پروتئین سلولی APOBEC3G در پرورتروویروس‌ها (pro-retroviruses) وارد می‌شود (۳۲).



شکل ۱ – دسته‌های ژنگانهای ناقص ویروسی: a) جهش‌ها در ژنگانهای ویروسی می‌توانند به تولید ژنگانهای ناقص منجر شوند. این جهش‌ها می‌توانند جهش‌های نقطه‌ای، بیش جهش‌ها یا جهش‌های تغییر چارچوب باشند که همانند سازی ویروس، بیان پروتئین ویروسی و/یا عملکرد پروتئین ویروسی را تغییر می‌دهد. b) ژنگان‌های ناقص ویروسی از نوع حذفی زمانی دیده می‌شود که طی همانند سازی پلیمراز بخشی از ژنگان را نادیده می‌گیرد و یک نسخه کوتاه شده از ژنگان تولید می‌کند. ژنگان‌های ناقص ویروسی حذفی می‌توانند نوآرایی‌های ژنگانی و مضاعف شدگی ژنی را نیز شامل شوند. حذف معمولاً به از دست رفتن یا تغییر بیان یک یا چند ژن منجر می‌شود. c) ژنگان‌های ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره و عکس دوباره در ویروس‌های RNA دار رشته‌ای منفی زمانی تولید می‌شوند که یک توالی به صورت مکمل و معکوس مضاعف می‌شود و ساختارهایی مانند دسته تابه برای ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره یا ساختارهای سنجاق سری برای ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع عکس دوباره ایجاد می‌کند. این مضاعف شدگی هنگامی روی می‌دهد که پلیمراز از رشته الگو جدا و به رشته نوساخته متصل می‌شود و انتهای ژنگان نوساخته را دوباره کپی می‌کند. بیشتر ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره و عکس دوباره‌ای که توصیف شده‌اند از انتهای '5 ژنگان تولید شده‌اند و در آن‌ها انتهای مکمل یک مضاعف شدگی از ناحیه ترجمه نشدنی (untranslated region (UTR)) حمل می‌کند. در مدل نشان داده شده در شکل، در ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره درجات مختلفی از جفت شدگی را می‌توان در ژن Z یافت. این نوع ژنگان‌ها رونویسی نمی‌شوند اما می‌توانند توسط پلیمراز ویروسی همانند سازی شوند.

پروتئین APOBEC3G نوکلئوتید های دئوکسی سیتیدین را در DNA ویروسی دآمینه می‌کند و باعث ایجاد بیش جهش‌هایی می‌شود که با توانایی ژنگان ویروس در ادغام در ژنگان میزبان و همانندسازی مداخله می‌کند. جالب اینکه، در مقابل یک فعالیت مداخله گر برای این پروویروس‌های جهش یافته، پیشنهاد شده است که پروویروس های ناقص برازندگی را افزایش می‌دهد و تکمیل بین آن‌ها ماندگاری ویروسی و بیماری زایی را پیش می راند (۳۳، ۳۴).

حذف‌ها. گونه‌های ژنگانی ویروسی که معمولاً به نام ژنگانهای ناقص ویروسی خوانده می‌شوند، ژنگان‌های کوتاه شده‌ای هستند که از حذف‌های بزرگ داخلی طی همانند سازی ویروس ناشی می‌شوند. ژنگان‌های ناقص ویروسی از نوع حذفی اغلب یک کوتاه شدگی بزرگ دارند که چند یا همه ژن‌های ضروری برای تکثیر را حذف می‌کند در حالی که پایانه‌های '5 و '3 و سایر عناصر ساختاری RNA را که برای اتصال پلیمراز، همانند سازی و/یا بسته بندی لازم است، حفظ می‌کند (۳۷–۳۵). واریانت هایی نیز وجود دارند که به نظر می‌رسد نتیجه چند اتفاق نوترکیبی و نوآرایی مانند حذف، درج، مضاعف شدگی و حتی وارونگی بخشی از ژنگان باشند. این ژنگانهای ناقص موزائیک خوانده می‌شوند (۴۰–۳۸) (شکل 1b).

کپی‌های دوباره[1]. ژنگان‌های ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره و عکس دوباره[2] ژنگانهای نوآرایی شده‌ای هستند که در آن‌ها یک توالی به صورت مکمل و معکوس مضاعف شده است تا ساختارهای ساقه مانند نظری ایجاد کند (ساختارهایی مانند دسته تابه برای ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره یا ساختارهای سنجاق سری برای ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع عکس دوباره) (۴۳–۴۱). ژنگان‌های ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره در بسیاری از ویروس‌های RNA دارِ رشته‌ای منفی گزارش شده‌اند و در فرایندی که ژنگانهای ناقص ویروسی با پایانه‌های '3 و '5 مکمل تولید می‌کند، از پایانه '5 ژنگان ایجاد شده‌اند (۴۴، ۴۵). اگر ناحیه مکمل ژنگان ناقص ویروسی شامل تقریباً تمام توالی شود، ژنگان ناقص ویروسی عکس دوباره خوانده می‌شود (۴۳) (شکل 1c).

پیش بینی می‌شود که ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره زمانی تولید می‌شوند که RNA پلیمراز وابسته به RNA[3] ویروسی از الگو جدا و به رشته نوساخته متصل می‌شود و انتهای ژنگان را دوباره کپی می‌کند (۴۶–۴۲).

تنوع ژنگان ناقص ویروسی طی عفونت. به طور تاریخی، دانشمندان بر این باور بودند که تنها برخی از ویروس‌ها ژنگانهای ناقص تولید می‌کنند و برای هر ویروس تنها یک یا چند ژنگان ناقص وجود دارد. اغلب مطالعات بر عفونت‌هایی با تعدد عفونت[4] بالا متکی بودند شرایطی که برای ظهور حذف‌های بزرگ (در نتیجه ژنگانهای ناقص ویروسی کوچک‌تر) مساعد است؛ حذف‌هایی که به دلیل زمان همانند سازی کمتر می‌توانند به سرعت در رقابت با ژنگان کامل و بزرگ‌تر پیروز شوند. به علاوه، این تحقیقات بر روش‌هایی با حساسیت تشخیصی پایین (مانند دیدن و تخلیص روی ژل‌های آگاروز) که تنها ژنگانهای ناقص ویروسی فراوان‌تر را جدا می‌کند، متکی بود. اما از دهه هشتاد میلادی شواهد مبنی بر وجود جمعیت‌هایی از گونه‌های متمایز ژنگانهای ناقص ویروسی در یک عفونت گزارش شد (۴۵، ۴۷). ما امروزه می دانیم که تنوع ژنگانهای ناقص ویروسی بسیار بیشتر از آن است که در ابتدا ارزیابی می‌شد و برخی از ژنگانهای ناقص ویروسی، احتمالاً با حفظ ویژگی‌هایی چون پیام‌های بسته بندی و عناصر همانند سازی که مزیت تکثیر می‌دهند یا با اکتساب توانایی مداخله در همانند سازی واریانت های دیگر، بهتر می‌توانند به وفور برسند. توالی یابی نسل بعد آشکار کرده است که ژنگانهای ناقص ویروسی عملاً در همه جمعیت‌های ویروسی حضور دارند و تنوع ژنگانهای ناقص ویروسی گسترده است اما فراوانی نسبی هر حذف یا نوآرایی متغیر است؛ چیزی که احتمالاً نشان می‌دهد عوامل متنوعی تولید ژنگان ناقص ویروسی و تجمع آن را پیش می‌برند. استفاده از فناوری توالی یابی تک سلول امکان کمی یابی دقیق فراوانی و تنوع ژنگانهای ناقص ویروسی را در یک سلول آلوده فراهم خواهد کرد و داده‌هایی در مورد توزیع واریانت های ژنگان ناقص ویروسی در یک جمعیت سلولی به دست خواهد داد.

از آنجا که اغلب ابزارهای هم تراز سازی توالی یابی نسل بعد خوانش های با بیش از دو جفت باز ناجور را فیلتر

[1] copy-backs
[2] snap-back
[3] RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)
[4] high multiplicity of infection (MOI)

می‌کنند، خوانش های مربوط به نقاط شکست حذف‌ها یا اتصلات نوآرایی‌ها هنگام هم ترازسازی ژنگان نوعی ویروس فیلتر می‌شوند. آنالیز دوباره خوانش های فیلتر شده این مشخصه‌های ژنگان ناقص ویروسی را شناسایی خواهد کرد. با توجه روز افزون به این بخش نادیده گرفته شده از جمعیت ویروسی، ابزارهای رایانه‌ای مانند ViReMa (۴۸)، DI-tector (۴۹) و VODKA (۵۰) ظهور پیدا کرده‌اند. این ابزارها خوانش هایی را که ممکن است به توالی‌های ویروسی حاصل از نوآرایی مربوط باشند، دوباره بررسی و امکان ارزیابی بهتر تنوع ژنگان ناقص ویروسی را فراهم می‌کند. امروزه یکی از چالش‌های داده‌های توالی یابی نسل بعد تمایز بین ژنگانهای ناقص ویروسی واقعی و خطای زمینه‌ای توالی یابی نسل بعد، کمی یابی فراوانی نسبی هر ژنگان ناقص ویروسی نسبت به ویروس کامل و نورمالایز کردن بین نمونه‌ها و دورهای[1] توالی یابی است؛ مسائلی که مشابه آنالیز ترانسکریپتومِ ایزوفرم های ژنتیکی است. به علاوه، با افزایش مجموعه داده‌ها و نمونه‌ها روشن شده است که گونه‌های ژنگان ناقص ویروسی که در میزبان‌ها و نوع سلول‌های متفاوت تولید می‌شوند الزاماً یکسان نیستند و عوامل تعیین کننده این تفاوت‌ها هنوز کشف نشده‌اند.

سازوکارهای تولید ژنگان ناقص ویروسی

تا مدت‌ها ژنگانهای ناقص ویروسی نتیجه خطاهای تصادفی RNA پلیمراز ویروسی پنداشته می‌شدند؛ زیرا این آنزیم فاقد فعالیت تصحیح است. اما شواهد جدید پیشنهاد می‌کنند که عوامل دیگری تولید ژنگان ناقص ویروسی را کنترل می‌کند و این راه را برای دستکاری تولید آن‌ها با اهداف درمانی باز می‌کند.

محصولات تصادفی یا رمزگذاری شده در ژنگان ویروسی؟ در حالی که ژنگانهای ناقص ویروسی توسط بسیاری از ویروس‌ها تولید می‌شوند، سازوکارهای مولکولی که تولید آن‌ها را کنترل می‌کنند، به خوبی شناخته نشده‌اند. یک نظریه غالب این است که ژنگانهای ناقص ویروسی از خطاهای تصادفی ایجاد می‌شوند که طی همانند سازی ویروس در تیترهای ویروسی بالا به دلیل ترکیبی از فقدان فعالیت تصححیح پلیمراز ویروس و حضور واریانت هایی با وفاداری کمتر که به ایجاد حذف‌ها کمک می‌کنند، رخ می‌دهد. در حمایت از این نظریه، آنالیزها با استفاده از رویکردهای توالی یابی عمیق آشکار کرد که چند گونه از ژنگانهای ناقص ویروسی طی عفونت تولید می‌شوند. به عنوان مثال، در عفونت‌ها با ویروس خانه گله[2]، یک ویروس RNA دار رشته‌ای مثبت، توالی یابی Click Seq و نانوپور یک جمعیت بزرگ و به نظر تصادفی از ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع حذفی را در ابتدای عفونت شناسایی کردند (۴۸).

جعبه ۲ واژه نامه

ذرات وُن مگنوس. ذرات ناقص ویروس انفلونزا با توانایی مداخله در تکثیر ویروس هومولوگ که توسط پربن وُن مگنوس در سال ۱۹۴۷ کشف شد.

ذرات ناقص مداخله گر. ذرات ویروسی حاوی بخشی از ژنگان ویروسی که تنها در حضور یک ویروس کمکی می‌تواند تکثیر شود و با تکثیر ویروس هومولوگ و سالم در درون سلول مداخله می‌کند.

ژنگان‌های ناقص ویروسی. ژنگان‌های ویروسی که در نبود یک ویروس استاندارد که همزمان سلول را آلوده کرده است نمی‌توانند همانند سازی کند. ژنگان‌های ویروسی با جهش‌ها، حذف‌ها یا انواع نوآرایی‌های ژنی ایجاد می‌شوند.

RNA پلیمراز وابسته به RNA. آنزیم ویروسی که RNA ویروسی را طی تکثیر ویروس کپی می‌کند.

تعدد عفونت. نسبت ویروس عفونی به سلول‌های هدف

ذرات درمانی مداخله گر. ژنگان‌های ناقص ویروسی مصنوعی با فعالیت مداخله گری قوی که به عنوان درمان برای رقابت با ویروس‌های استاندارد پیشنهاد شده‌اند.

به علاوه، آنالیزهای توالی یابی نمونه‌های بینی و حلق افراد آلوده به ویروس آنفلونزا یا عفونت با متاپنوموویروس انسانی[3] یا ویروس سرخک درشیشه چند گونه ژنگان ناقص ویروسی را در این عفونت‌ها آشکار کرد (۵۳-۵۱). اما، بر خلاف ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع حذفی یا جهش نقطه‌ای، ژنگان‌های ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره غالباً به صورت جمعیت‌های غالب و متمایز در یک سلول یا بافت آلوده یافت می‌شوند و به نظر می‌رسد در عفونت‌های مستقل با همان ویروس والدی (۵۴، ۵۵) یا با سویه‌های ویروسی متفاوت (۵۶)، همان ژنگان ناقص از نوع کپی دوباره تولید می‌شود. اثبات وجود نقاط داغ[4] برای تولید ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره از

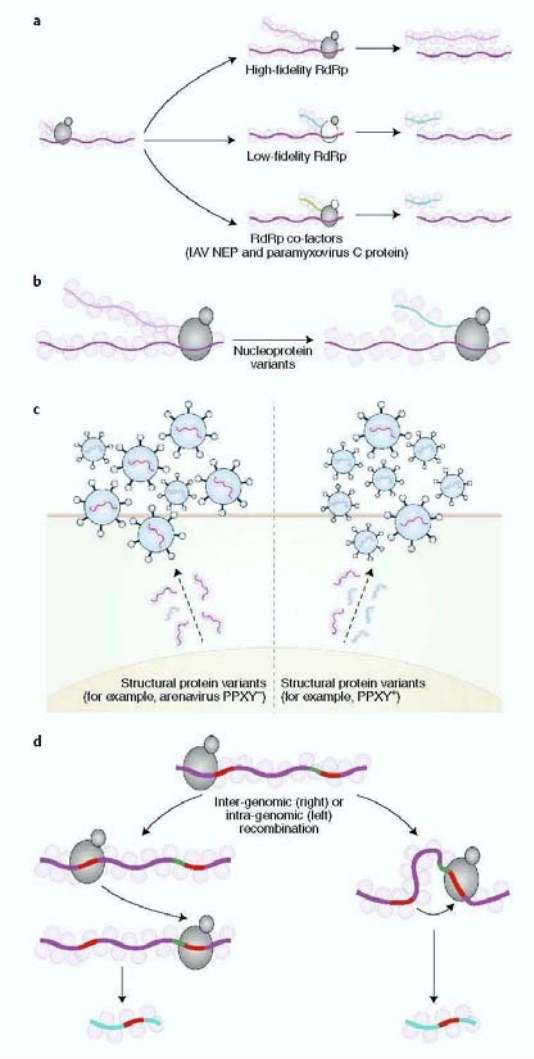
[1] runs

[2] Flock house virus
[3] metapneumovirus
[4] hotspots

ویروس سین سیشیال تنفسی[1] و شناسایی نوکلئوتید های خاصی که معین می‌کنند کجا ژنگان‌های ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره بار دیگر متصل شوند، نشان می‌دهد که تولید ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره کاملاً تصادفی نیست اما در عوض توالی‌های خاصی که در ژنگان ویروس رمزگذاری شده‌اند تشکیل آن‌ها را هدایت یا تسهیل می‌کنند (۵۰). در حمایت از این فرضیه، رویکردهای توالی یابی عمیق جمعیت‌های غالب و متمایزی از ژنگان ناقص ویروسی را در عفونت‌هایی با ویروس پاراآنفلونزا ۵[2] و ویروس استوماتیت وزیکولی آشکار کرده‌اند (۵۷، ۵۸). طی عفونت با آنفلونزا، تشابهات توالی بین نواحی '5 و '3 که نواحی حذف را در ژنگان ناقص ویروسی احاطه می‌کنند، گزارش شده است (۵۱، ۵۹)؛ این پیشنهاد می‌کند که در تولید ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع حذفی نیز تا حدی حفاظت شدگی وجود دارد. این مشاهدات نشان می‌دهد که حداقل در برخی از عفونت‌ها، تولید ژنگانهای ناقص ویروسی یک فرایند کاملاً تصادفی نیست و در عوض توالی‌هایی که توسط ویروس رمزگذاری می‌شوند به تولید و/ یا تکثیر ژنگانهای ناقص ویروسی غالب کمک می‌کنند. اینکه آیا حفاظت شدگی ویژگی برخی از انواع ژنگانهای ناقص ویروسی است یا خیر و اینکه کدام توالی‌های خاص و/ یا ساختارهای RNA در این شرایط به تولید ژنگانهای ناقص ویروسی منجر می‌شود، باید مشخص شود.

نقش پروتئین‌های ویروسی. تعدادی از پروتئین‌های ویروسی در تولید ژنگانهای ناقص ویروسی دخیل هستند که مطالعه شده ترین آن‌ها RNA پلیمراز وابسته به RNA است. پلیمرازهای ویروسی مهندسی شده با وفاداری کمتر و نرخ جهش بیشتر ویروسی‌های بسیار تضعیف شده‌ای تولید می‌کنند (۶۰، ۶۱) که در بسیاری از موارد با افزایش تولید ژنگانهای ناقص ویروسی همراه است (۶۵-۶۲) (شکل 2a). گرچه سازوکارهایی که به تولید ژنگان ناقص ویروسی توسط RNA پلیمرازهای وابسته به RNA جهش یافته منجر می‌شوند هنوز فرضی هستند، چند مدل شکل گرفته‌اند.

به عنوان مثال، در ویروس‌هایی که RNA پلیمرازهای وابسته به RNA وفاداری کمی دارند مانند ویروس سیندبیس[3] یا تومبوس ویروس[4]، افزایش تولید ژنگانهای ناقص ویروسی با افزایش نرخ نوترکیبی RNA ویروسی همبستگی دارد (۶۳، ۶۵).



شکل ۲ - سازوکارهای تولید ژنگان ناقص ویروسی: a) تغییرات در وفاداری RNA پلیمراز وابسته به RNA ویروسی به دلیل جهش یا تاثیرات کوفاکتورهای رمزگذاری شده توسط ویروس مانند پروتئین صادرات هسته ویروس انفلونزا A (IAV) یا پروتئین C پارامیکسوویروس می‌تواند به تولید ژنگانهای ناقص ویروسی کمک کند. b) واریانت هایی از نوکلئوپروتئین که به صورت متفاوت به RNA ویروسی متصل می‌شوند می‌توانند به تولید ژنگان ناقص ویروسی کمک کند. c) واریانت هایی از پروتئین‌های ساختاری مانند دمین PPXY در پروتئین ماتریکس آرناویروس ها می‌تواند به تولید ژنگان ناقص ویروسی منجر شود. d) رویدادهای نوترکیبی درون و بین ملکولی با استفاده از توالی‌های هومولوگ (قرمز) می‌تواند به ایجاد ژنگانهای ناقص ویروسی حذفی منجر شود.

[1] respiratory syncytial virus (RSV)
[2] parainfluenza virus 5
[3] Sindbis virus
[4] tombusvirus

به علاوه، طی عفونت با ویروس انفلونزا، تغییر در توانایی طویل شدن (انجام)[1] پلیمراز با تغییر در تولید ژنگانهای ناقص ویروسی همراه است (۶۴). نقشی برای فعالیت چندپارش[2] پلیمراز نیز به تازگی به عنوان عاملی برای پیش برد تولید ژنگان ناقص ویروسی طی عفونت با ویروس انفلونزا پیشنهاد شده است (۶۲).

پروتئین‌های ویروسی دخیل در تنظیم رونویسی و همانند سازی ویروس نیز با تولید ژنگانهای ناقص ویروسی مرتبط هستند. جهش‌ها در پروتئین صادرات هسته ویروس انفلونزا[3] که سنتز RNA مکمل را تنظیم می‌کند باعث افزایش تولید ژنگان ناقص ویروسی می‌شود (۶۶). به طور مشابه، حذف یا جهش‌ها در پروتئین‌های C پارامیکسوویروس که تغییر الگو را از همانند سازی پاد ژنگانی به ژنگانی تغییر می‌دهد به افزایش تولید ژنگان ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره منجر می‌شوند (۵۳، ۵۶). عجیب اینکه، در عفونت‌ها با ویروس انفلونزایی که فاقد پروتئین صادرات هسته یا پارومیکسو ویروسی که فاقد C است، تولید ژنگان ناقص ویروسی در شرایطی مشاهده می‌شود که به طور طبیعی تولید ژنگانهای ناقص ویروسی را محدود می‌کنند؛ شرایطی مانند تعدد عفونت پایین. ممکن است افزایش تولید ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره در این شرایط به بیشتر در دسترس بودن الگو یا اثر غیر مستقیم فعالیت پلیمراز ویروسی مرتبط باشد اما سازوکار دقیق هنوز مشخص نشده است. به علاوه، جهش در یک آمینواسید در نوکلئوپروتئین ویروس سندای[4] که تراکم ریبونوکلئوپروتئین را کاهش می‌دهد با تولید ژنگان ناقص ویروسی همراه است (۶۷) (شکل 2b). در نهایت، در عفونت با ویروس کوریومننژیت لنفوسیتی[5]، دمین PPXY در پروتئین ماتریکس تولید ذرات ویروسی حاوی ژنگانهای ناقص اما نه ذرات حاوی ژنگان استاندارد، را پیش می‌برد (۶۸) (شکل 2c).

تغییر الگو ضمن همانند سازی. نوترکیبی RNA یک عامل پیش برنده اصلی در تشکیل ژنگان ناقص ویروسی از نوع حذفی است. یک مدل غالب پیشنهاد می‌کند که توالی‌ها در نقطه شکست یا پیام‌های ساختاری در RNA الگو به رپلیکاز کمک می‌کنند تا به RNA پذیرنده تغییر الگو دهد و سنتز را از سر بگیرد (شکل 2d). در سنجش‌های بیوشیمیایی که در آن‌ها از RNA پلیمرازهای وابسته به RNA مربوط به تعداد زیادی از ویروس‌های RNA داراستفاده شده است، نوترکیبی وابسته به رپلیکاز ثابت شده است (۷۱-۶۹). تغییراتی از این مدل شامل سازوکار تغییر الگوی اجباری می‌شود که در آن رپلیکاز پس از برخورد به انتهای '5 الگو، الگو را عوض می‌کند و دوپارهای[6] RNA سر به دم[7] تولید می‌کند. اگر الگوها ژنگانهای ناقص ویروسی باشند، این تغییر الگو به ایجاد دوپارهای ژنگانی ناقص ویروسی سر به دم منجر می‌شود. انتهای '5 می‌تواند با اندونوکلئازها و اگزونوکلئازها نیز تغییر کند و به نسخه‌های جدیدی از این ژنگان‌ها منجر شود (۷۲).

ویرایش RNA به عنوان عامل پیش برنده در تنوع ژنگانهای ناقص ویروسی. ویرایش RNA ویروسی به افزایش جهش منجر می‌شود و همان طور که در مورد عفونت‌های ماندگار با ویروس سرخک گزارش شده است، می‌تواند به تولید ژنگانهای ناقص ویروسی بیانجامد (۳۱). به علاوه، نرخ بالای ویرایش RNA ویروسی از آدنین به گوانین (یا یوراسیل به سیتوزین) توسط آنزیم آدنوزین دآمینازعمل کننده بر RNA[8] در ژنگانهای ناقص ویروس استوماتیت وزیکولی، متاپنوموویروس انسانی و ویروس سرخک رخ می‌دهد (۳۸، ۵۲، ۵۳). در برخی موارد، ویرایش RNA توانایی ژنگانهای ناقص ویروسی را در تحریک سیستم ایمنی تنظیم می‌کند (۵۳). اما به نظر می‌رسد اثر ویرایش ژنگان ناقص ویروسی بر همانند سازی ویروس مختص هر ویروس باشد (۷۳). اینکه آیا ژنگانهای ناقص ویروسی نسبت به ژنگان استاندارد نرخ بالاتری از ویرایش دارند یا خیر و نیز اثر تنوع حاصل از ویرایش بر تکامل و انتخاب ژنگان ناقص ویروسی باید مشخص شود.

نقش در بیماری زایی

ژنگان‌های ناقص ویروسی سه عملکرد خوب توصیف شده دارند که به نقش آن‌ها در بیماری زایی مرتبط است: مداخله در همانند سازی استاندارد ویروس، تحریک سیستم ایمنی و ایجاد ماندگاری ویروسی (شکل 3a).

[1] elongation
[2] multimerization
[3] nuclear export protein (NEP also called NS2)
[4] Sendai virus (Sev)
[5] lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)

[6] dimers
[7] head to tail
[8] adenosine deaminase acting on RNA

مداخله در همانندسازی و تولید ویروس. ژنگان‌های ناقص ویروسی طی پژوهش‌هایی کشف شد که برای یافتن عوامل مسئول کاهش عفونت ویروس انفلونزا پس از پاساژ در تیترهای بالا انجام می‌شد (۲). در اغلب ویروس‌های RNA دار رشته‌ای مثبت و منفی ژنگانهای ناقص ویروسی یافت شده‌اند که می‌توانند با همانند سازی ویروس والدی خود هم درشیشه و نیز درزیوه مداخله کنند (۵۴، ۸۲-۷۴). در سلول‌هایی که همزمان با ژنگان ناقص ویروسی و ژنگان کامل آلوده می‌شوند، ژنگان‌های ناقص، به دلیل طول کوتاهتر و در مورد گونه‌های کپی دوباره، به دلیل پروموتر های دنباله رو[1] بسیار کارآمد و احاطه کننده خود نسبت به ژنگانهای کامل سریع‌تر تجمع می‌یابند (۸۳، ۸۴). یک نظریه غالب برای توضیح اینکه ژنگانهای ناقص ویروسی چگونه در همانندسازی استاندارد ویروس مداخله می‌کنند بر اساس رقابت مشاهده شده بین ژنگانهای ویروسی ناقص و کامل بر سر اجزای ویروسی لازم برای تکثیر است (شکل 3b). همچنان که ژنگانهای ناقص ویروسی در سطوح بالا تجمع پیدا می‌کنند، پیش بینی می‌شود که آن‌ها می‌توانند به صورت مستقیم با به انحصار در آوردن پلیمراز ویروسی و/یا رقابت بر سر پروتئین‌های ساختاری در تکثیر ویروس کمکی مداخله کنند (۸۴، ۸۵).

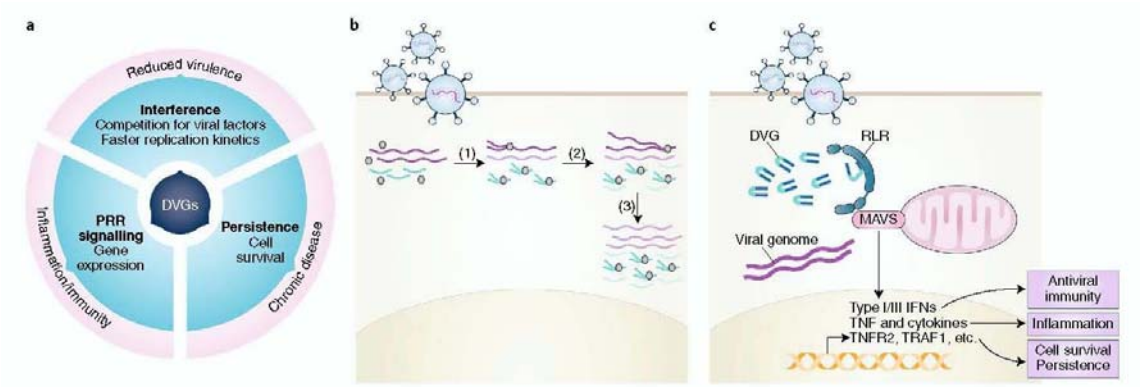
لازم به ذکر است که در حالی که اغلب شواهد از این تصور حمایت می‌کنند که ژنگانهای ناقص کوتاه‌تر ناشی از حذف‌های بزرگ، به دلیل همانند سازی سریع‌تر، برای رقابت با ویروس‌های با ژنگان کامل بهترین رقیب هستند، اغلب این مطالعات در شرایط کشت سلول با تعدد عفونت بالا انجام شده‌اند که به پویایی رقابت بر اساس سینتیک همانند سازی کمک می‌کند. این سؤال مطرح می‌شود که آیا یک ژنگان ناقص حذفیِ بزرگتر که توالی‌های رمزگذار بیشتری را حفظ کرده است اما جهش‌هایی در ژن‌های رمزگذار پروتئین حمل می‌کند (ژنگانی که از ژنگان کامل سریع‌تر اما از ژنگان ناقص کوتاه‌تر کندتر همانند سازی می‌کند)، به دلیل تولید پروتئین‌های ناقصی که با پروتئین‌های وحشی مداخله می‌کنند (به عنوان مثال در ساختارهای چند جزئی مانند کپسیدها و رپلیکازها)، می‌تواند در برخی شرایط برای ویروس وحشی رقیب بهتری باشد؟

به علاوه، مطالعات جدید نشان داده‌اند که طی عفونت، ژنگان‌های ناقص ویروسی و ژنگانهای کامل در سلول‌های متفاوتی غالب می‌شوند و به سلول‌های آلوده متفاوت عملکردهای متمایزی اعطا می‌کنند (۸۶، ۸۷). در حالی که سلول‌هایی که در آن‌ها ژنگان کامل غالب شده است، تولید کننده‌های اصلی ذرات ویروسی حاوی ژنگانهای کامل و یا ناقص هستند، سلول‌های غنی از ژنگانهای ناقص ذرات ویروسی زیادی تولید نمی‌کنند (۸۶). این داده‌ها بر لزوم در نظر گرفتن تاثیرات ژنگان‌های ناقص ویروسی در سطح تک سلول و در سطح جمعیت طی مداخله تاکید می‌کنند.

ماشه‌های مصونیت پاد ویروسی. ژنگان‌های ناقص ویروسی، مخصوصاً آن‌هایی که از نوع کپی دوباره هستند، قویاً بیان اینترفرون های نوع یک و سه[2]، فاکتور نکروز تومور[3]، اینترلوکین ۶[4]، اینترلوکین 1β[5] و سایر سیتوکین های پیش التهابی را القا می‌کنند و محرک‌های اصلی مصونیت پاد ویروسی در بسیاری از عفونت‌ها هستند (۸-۶، ۵۲، ۵۴، ۵۵، ۹۰-۸۸) (شکل 3c). به علاوه، تحریک با ژنگان ناقص ویروسی توانایی ارائه آنتی ژن سلول‌های ارائه کننده آنتی ژن را بهینه سازی می‌کند (۹۱، ۹۲). شواهد رو به افزایشی نشان می‌دهد که توانایی ژنگانهای ناقص ویروسی در تحریک سیستم ایمنی درزیوه و طی عفونت‌های طبیعی در انسان نیز حفظ شده است. بقای بیشتر موش‌های آلوده در عفونت‌های حاوی ژنگانهای ناقص ویروسی برای چند ویروس گزارش شده است (۵، ۱۹، ۹۳). در موش‌های آلوده با ویروس‌های تنفسی سندای، آنفلونزا یا سین سیشیال تنفسی، اینترفرون ها و سیتوکین های پیش التهابی تنها زمانی قویاً القا می‌شوند که ژنگانهای ناقص ویروسی تا سطوح قابل تشخیصی تجمع یافته باشند (۵۴ و ۵۵). یافتن ژنگانهای ناقص ویروسی در ترشحات تنفسی کودکان آلوده با ویروس سین سیشیال تنفسی با بیان ژن‌های پاد ویروسی مرتبط است (۵۵) و ویروس‌های بسیار بیماری زای آنفلونزا که نمی‌توانند در انسان پاسخ‌های پاد ویروسی قوی القا کنند توانایی ضعیفی برای تولید ژنگانهای ناقص ویروسی دارند (۶۲).

[1] trailer promoters

[2] type I and III interferons
[3] tumour necrosis factor
[4] interleukin (IL)-6
[5] IL-1β



شکل ۳ – عملکردها و شیوه‌های کار ژنگانهای ناقص ویروسی: a) نگاه کلی به تاثیرات شناخته شده ژنگانهای ناقص ویروسی بر ویروس استاندارد و سلول‌های میزبان و نیز اثر آن‌ها بر بیماری زایی ویروسی. b) سازوکار پیشنهادی برای رقابت بر سر محصولات ویروسی در سلول‌های حاوی چند کپی از ویروس استاندارد و ژنگانهای ناقص ویروسی که به تداخل منجر می‌شود. ۱) پلیمراز ویروسی، به دلیل طول کوتاه‌تر ژنگان و وجود پروموترهای دنباله رو احاطه کننده، ژنگان‌های ناقص ویروسی را به صورت کارآمدتری نسبت به ویروس استاندارد همانندسازی می‌کند. ۲) این ویژگی‌های ژنگان ناقص ویروسی به تجمع سریع‌تر آن‌ها در سلول آلوده منجر می‌شود. ۳) ژنگان‌های ناقص ویروسی در نهایت بر ویروس استاندارد غلبه می‌کنند، گونه غالب را تشکیل می‌دهند و در همانند سازی ویروس استاندارد مداخله می‌کنند. c) سازوکار پیشنهادی برای تحریک سیستم ایمنی و بقای سلول توسط ژنگان ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره. سلول‌های آلوده نخست ژنگانهای ناقص ویروسی را از طریق حسگرهای RNA شامل RIG-I یا MDA5 تشخیص می‌دهند، این حسگرها از طریق پروتئین آداپتور MAVS برای تولید و ترشح سیتوکین های پیش التهابی اینترفرون نوع یک و سه و پروتئین‌های پیش بقا پیام رسانی می‌کنند.

ژنگان‌های ناقص ویروسی با توانایی تحریک سیستم ایمنی می‌توانند توسط گیرنده‌های شناسایی الگو[1] از جمله گیرنده‌های شبه Toll (TLRs) و گیرنده‌های شبه RIG-I (RLRs) شناسایی شوند. در حالی که پیام رسانی TLR برای تولید اینترفرون های نوع یک در شیشه در پاسخ به ژنگانهای ناقص ویروسی ضروری نیست، پیام رسانی RLR لازم است (۵۵، ۸۸، ۹۸-۹۴). ژنگان‌های ناقص ویروس سندای از نوع کپی دوباره نسبت به ژنگانهای ناقص حذفی این ویروس محرک‌های قوی‌تری برای سیستم ایمنی هستند (۸۹) و در میان قوی‌ترین القا کننده‌های شناخته شده پاسخ پادویروسی محسوب می‌شوند. بنابراین، اغلب آنچه درباره فعالیت محرک ایمنی ژنگانهای ناقص ویروسی می دانیم بر اساس مطالعه ژنگان ناقص ویروس سندای از نوع کپی دوباره است. ملکول RNA ژنگان ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره به RIG-I متصل می‌شود (۹۴، ۹۷، ۹۹) و ژنگانهای ناقص ویروس‌های سندای، سرخک و سین سیشیال تنفسی قویاً پیام رسانی وابسته به RIG-I را تحریک می‌کنند (۵۵، ۹۲، ۹۵). RIG-I با اتصال دی یا تری فسفات‌های '5 در RNA فاقد کلاهک یا نواحی کوتاهی از RNA دو رشته‌ای به راه می افتد. تیمار با فسفاتاز توانایی ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره را که درشیشه رونویسی شده‌اند در آغاز تولید اینترفرون پس از تراآلایی[2] سرکوب می‌کند؛ این مشاهده از نقش RIG-I در حس کردن ژنگان ناقص ویروسی پیشتیبانی می‌کند (۹۱، ۹۴، ۹۶). ژنگان‌های ناقص ویروس سندای می‌توانند به پروتئین وابسته به تمایز ملانوما ۵ (MDA5)[3] نیز متصل شوند (۸۸، ۹۴) اما نقش MDA5 در حس کردن سایر ژنگانهای ناقص ویروسی واضح نیست (۹۹، ۱۰۰). پروتئین‌های سلولی دیگری نیز می‌توانند به ژنگانهای ناقص ویروسی متصل شوند. به عنوان مثال، ژنگان‌های ناقص ویروس سرخک به یک پروتئین متصل شونده به RNA دو رشته‌ای، به نام پروتئین فعال کننده کیناز القا شده توسط اینترفرون، متصل می‌شود تا RIG-I را بهتر فعال کند (۹۶).

القای پیام رسانی RLR توسط ژنگان ناقص ویروسی تنها نتیجه افزایش محتوای RNA ویروس در سلول‌های آلوده نیست؛ چرا که افزایش مقدار ویروسی که نمی‌تواند ژنگان ناقص تولید کند پاسخ اینترفرون را افزایش نمی‌دهد (۵۴، ۸۸، ۹۲). اساساً، ژنگان‌های ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره، حتی در حضور پادکنش‌های مسیرهای حسگر

[1] pattern recognition receptors (PRRs)

[2] transfection
[3] melanoma differentiation-associated protein 5

سلولی که توسط ویروس رمزگذاری شده‌اند، به صورت کارآمد حس می‌شوند (۸۸، ۹۲). این مشاهدات پیشنهاد می‌کنند که ویژگی‌های خاصی از ژنگانهای ناقص ویروسی به تشخیص آن‌ها طی عفونت کمک می‌کنند. دانشمندان بر این باور بودند که قطعه RNA دو رشته‌ای بلندی که پیش بینی می‌شود توسط پایانه‌های مکمل معکوس ژنگانهای ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره ایجاد شود یک عامل مهم در فعالیت محرک ایمنی آن‌ها باشد (۸، ۹۹، ۱۰۱). اما مدارک جدید نشان می‌دهد که سایر ویژگی‌های ژنگانهای ناقص ویروسی اثر بزرگ‌تری بر توانایی آن‌ها در تحریک سیستم ایمنی دارد. مدل سازی ساختاری یک موتیف حلقه ساقه ۴۴ نوکلئوتیدی (DVG_{70-114}) را در ژنگان ناقص شماره ۵۴۶ ویروس سندای-یک ژنگان ناقص ویروسی از نوع کپی دوباره که به خوبی مطالعه شده است و محرک قوی سیستم ایمنی محسوب می شود-شناسایی کرده است که در ژنگان ویروس سندای وجود ندارد و نقاط شکست و اتصال دوباره ژنگان ناقص از نوع کپی دوباره را در بر می‌گیرد. حذف DVG_{70-114} توانایی ژنگان ناقص ویروسی را در تحریک سیستم ایمنی کاهش می‌دهد، در حالی که وارد کردن این موتیف در یک RNA غیر فعال از نظر ایمنی توانایی آن را در القای بیان اینترفرون های نوع یک و ژن‌های تحریک شده با اینترفرون بهبود می‌بخشد (۹۴). DVG_{70-114} هماهنگ با موتیف تری فسفات '5 عمل می‌کند تا RIG-I را فعال کند و باعث بَسپارش[1] بیشتر RLR، نشانه فعال سازی، می‌شود (۹۴). DVG_{70-114} در چهارچوب عفونت با ویروس سندای فعال است؛ چرا که ویروس‌های نوترکیب حامل ژنگانهای ناقصی که فاقد این موتیف هستند به طور معنی داری توانایی خود را در تحریک سیستم ایمنی از دست می‌دهند (۹۴). عدم موفقیت در تشخیص RNA دو رشته‌ای از طریق رنگ آمیزی ایمنی طی عفونت با ویروس سندای (۱۰۲) و نیز حفظ توانایی ژنگانهای ناقص ویروس سندای از نوع کپی دوباره در تحریک ایمنی حتی پس از اختلال در جفت شدن پایانه‌های '5 و '3 آن (۹۴)، از این تصور پشتیبانی می‌کند که پایانه‌های مکمل طویل پیش بینی شده ژنگانهای ناقص ویروس از نوع کپی دوباره نقش کمی در آغاز مصونیت پادویروسی ایفا می‌کند. اینکه چه زمانی و چگونه DVG_{70-114} در زمان عفونت در معرض قرار می‌گیرد و اینکه آیا موتیف های مشابه در سایر ژنگانهای ناقص ویروسی با توانایی بالا در تحریک سیستم ایمنی وجود دارد یا خیر، باید مشخص شود.

تحریک ایمنی با ژنگان ناقص ویروسی در تنظیم عفونت‌ها در حشرات نیز یک عامل مهم محسوب می‌شود. مشابه گیرنده‌های شناسایی الگو مانند RIG-I و MDA5 در پستانداران، حشرات RNA ویروسی را از طریق پروتئین Dicer-2 حس می‌کنند. این پروتئین RNA ویروسی را به RNA های کوچک مداخله گری پردازش می‌کند که از حشرات در برابر عفونت دوباره با همان ویروس محافظت می‌کند (۱۰۳). ژنگان‌های ناقص ویروسی هدف‌های اصلی Dicer-2 هستند. این مشاهدات نشان می‌دهد که تحریک سیستم ایمنی توسط ژنگانهای ناقص ویروسی امری معمول است و ممکن است اثر مهمی بر شیوع عوامل بیماری زا درون گونه‌ها و بین آن‌ها داشته باشد.

تسهیل کنندگان ماندگاری ویروس RNA دار. ذرات ناقص مداخله گر ایجاد کشت‌های سلولی با عفونت‌های ماندگار را در انواع عفونت‌ها با ویروس‌های RNA دار مانند ویروس جنگل سمولیکی[2]، آنفلونزا، سندای، ابولا و اوریون تسهیل می‌کند (۱۰، ۱۵-۱۳، ۷۴، ۱۰۷-۱۰۴). این شواهد با مطالعاتی در موش همراه است که نشان می‌دهد عفونت با ویروس جنگل سمولیکی یا ویروس کوریومننژیت لنفوسیتی حاوی ذرات ناقص مداخله گرعفونت های ماندگار ایجاد می‌کند (۱۸، ۱۰۸) و در مطالعه دیگری ژنگانهای ناقص ویروسی در مغز بیماران انسانی گزارش شده است که پس از عفونت با ویروس سرخک، به دلیل پان آنسفالیت اسکلروزان تحت حاد[3] جان باخته‌اند (۱۷).

در بسیاری از عفونت‌های ماندگار درشیشه (۱۰۹، ۱۱۰) و درزیوه (۱۹، ۱۰۹)، ذرات ناقص مداخله گر و ویروس‌های کامل به صورت ناهمزمان چرخه را کامل می‌کنند. چرخه در یک الگوی قابل پیش بینی رخ می‌دهد و با استفاده از شکلی از مدل طعمه-شکار به صورت ریاضی مدل سازی شده است (۱۱۱). یک نظریه برای توضیح چرخه نا همزمان ژنگان‌های ناقص و کامل ویروسی طی ماندگاری در سال ۱۹۷۰ ارائه شد (۳). این نظریه که بر اساس اثر

[1] polymerization

[2] Semuliki Forest virus
[3] subacute sclerosing panencephalitis

تداخل ژنگانهای ناقص ویروسی بر همانند سازی ژنگان کامل شکل گرفته است، پیشنهاد می‌کند که ذرات ناقص مداخله گر هنگام تکثیر ویروس تجمع می‌یابند تا به علظت های بالا برسند و اکثریت را تشکیل دهند. در این شرایط، ژنگان‌های ناقص ویروسی بر سر دستگاه همانند سازی با ژنگان کامل ویروس رقابت می‌کند و باعث کاهش مقدار ویروس کامل می‌شود. طی این فرایند، برخی از سلولی‌هایی که پیشتر آلوده نشده بودند با ویروس استاندارد آلوده می‌شوند و چرخه را از سر می‌گیرند. جالب اینکه، در برخی عفونت‌های ماندگار مقدار ذرات ناقص مداخله گر به نظر ثابت می‌رسد (۱۱۲). آنچه این الگوی های چرخه‌ای را در برخی ویروس‌ها، اما نه در دیگر ویروس‌ها، پیش می راند و اینکه آیا عوامل میزبان مانند نوع سلول آلوده الگوی چرخه را تحت تأثیر قرار می‌دهد یا خیر، هنوز نا شناخته است.

مدارک جدید نشان می‌دهد که سازوکارهای دخیل در ایجاد ماندگاری پیچیده‌تر از یک رقابت درون سلولی ساده بر سر دستگاه همانند سازی بین انواع متفاوت ژنگانهای ویروسی است (۸۷). با استفاده از دو رگه سازی RNA فلورسنت در جا، زو[1] و همکارانش نشان دادند که طی عفونت با ویروس سندای یا ویروس سین سیشیال تنفسی حاوی ذرات ناقص مداخله گر، در جمعیت آلوده ناهمگنی در محتوای ژنگانهای ویروسی دیده می‌شود (۸۷). درحالی که برخی از سلول‌ها غنی از ژنگانهای ناقص ویروسی هستند، سلول‌های دیگر غنی از ژنگانهای کامل و استاندارد ویروس هستند. سازوکارهای این ناهمگنی در حال حاضر ناشناخته است، اما تفاوت‌های عملکردی چشمگیری بین این جمعیت‌های سلولی به تدریج آشکار می‌شوند (۸۶، ۸۷). سلول‌های غنی از ژنگانهای ناقص ویروسی مسیر حس گر RLR را به کار می‌گیرند و اینترفرون ها و ملکولی های پیش التهابی دیگر را مانند فاکتور نکروز تومور تولید می‌کنند. به علاوه، این سلول‌ها یک برنامه بقا را القا می‌کنند که این برنامه نیز به پیام رسانی از طریق مسیر RLR وابسته است. این برنامه‌ها سلول‌های غنی از ژنگانهای ناقص ویروسی را از مرگ به واسطه فاکتور نکروز تومور محافظت می‌کند، در حالی که سلول‌های فاقد ژنگانهای ناقص طی عفونت از بین می‌روند. سلول‌های غنی از ژنگانهای ناقص که باقی می‌مانند می‌توانند ماه‌ها به صورت یک عفونت ماندگار تکثیر شوند. این سازوکار برای تحریک متناقض مصونیت پاد ویروسی و ایجاد ماندگاری توسط ژنگانهای ناقص ویروسی توضیحی فراهم می‌کند. هنوز روشن نیست چگونه بقای بهتر سلول‌های غنی از ژنگانهای ناقص ویروسی به ماندگاری منجر می‌شود و چگونه این بقا با چرخه ژنگان ناقص ویروسی و ویروس استاندارد که در بسیاری از عفونت‌ها مشاهده می‌شود، جور در می‌آید. چرخه ممکن است در سطح درون سلولی- جایی که هر سلول آلوده با رقابت بر سر دستگاه همانند سازی و مداخله در عملکرد آن وارد چرخه‌هایی برای غنی سازی ژنگان استاندارد یا ناقص ویروس می‌شود- و یا در سطح جمعیت-جایی که سلول‌های آلوده ترکیب ویروس استاندارد یا ذرات ناقص مداخله گر را برای آلوده کردن سلول‌های جدید معین خواهد کرد-رخ دهد.

استفاده به عنوان پاد ویروس‌ها و یاور واکسن‌ها[2]

قابلیت قابل توجه ژنگانهای ناقص ویروسی در تحریک سیستم ایمنی و مداخله باعث می‌شود آن‌ها نامزدهای خوبی برای یاور واکسن‌ها و پاد ویروس‌ها باشند (۱۱۳، ۱۱۴). توانایی ذرات ناقص مداخله گر در مداخله در تکثیر ویروس‌های استاندارد و کاهش بیماری وابسته به ویروس به صورت گسترده در موش طی عفونت با نمونه‌های ویروسی حاوی ذرات ناقص مداخله گر، حتی هنگامی که واکسن حاوی ویروس استاندارد غیر فعال شده با تیمار فرا بنفش بود، نشان داده شده است (۴، ۵۴، ۷۵، ۷۷، ۱۱۵، ۱۱۶). در راسوهای اهلی که با واکسن انفلونزا حاوی تنها ذرات ناقص مداخله گر واکسنیه شده بودند یک محافظت مشابه گزارش شده است (۱۱۷). ذرات ناقص مداخله گر مهندسی شده به صورت مصنوعی با توانایی مداخله گری قوی (ذرات مداخله گر درمانی[3]) به تازگی به عنوان تدبیری برای کنترل عفونت‌های ویروسی پیشنهاد شده‌اند. ذرات مداخله گر درمانی به صورت نظری سریع‌تر از ویروس‌های نوع وحشی تکثیر می‌شوند و در نتیجه از انتشار و انتقال ویروس جلوگیری می‌کنند. ذرات مداخله گر درمانی این مزیت را دارند که به دلیل وابستگی آن‌ها به یک ویروس کمکی برای تکثیر، فقط در موجوداتی فعال هستند که قبلاً با ویروس نوع وحشی آلوده شده‌اند (۱۱۸،

[1] Xu

[2] vaccine adjuvants
[3] therapeutic intefering particles (TIPs)

۱۱۹). ذرات مداخله گر درمانی هنوز در فاز اکتشافی هستند. اینکه چگونه آن‌ها بر ماندگاری ویروس، تولید جهش‌های سازشی و تولید ویروس‌های عفونی جدید اثر می‌گذارند، باید مشخص شود.

اینکه آیا محافظت ایجاد شده توسط ذرات ناقص مداخله گر طبیعی یا مصنوعی به دلیل مداخله مستقیم در تکثیر ویروس استاندارد است یا از طریق توانایی قوی ژنگانهای ناقص ویروسی در تحریک سیسم ایمنی نا مشخص است. ژنگان‌های ناقص ویروس سندای از نوع کپی دوباره توانایی ارائه آنتی ژن سلول‌های دندریتی موش و انسان را افزایش می‌دهد و باعث فعال سازی بهتر سلول‌های T می‌شود (۹۱). به علاوه، واکسن‌های آزمایشی بر علیه ویروس انفلونزا و ویروس سین سیشیال تنفسی که با ژنگانهای ناقص ویروس سندای رونویسی شده درشیشه همراه و به صورت زیر پوستی، درون ماهیچه‌ای یا درون بینی وارد شده‌اند، باعث تولید آنتی بادی بیشتر و حفاظت بیشتر در مقابل چالش ویروسی می‌شوند (۹۱، ۱۲۰). الیگو نوکلئوتیدهای مشتق از ژنگان ناقص ویروس سندای حاوی موتیف محرک ایمنی DVG_{70-114} یاورهای موثری هستند که می‌توانند پاسخ‌های سلولی و هومورال را علیه ویروس غیر فعال شده و واکسن‌های پروتئینی را به سمت پاسخ‌های ایمنی نوع یک مانند آنتی بادی‌هایی از ایزوتوپ IgG2a/c، سلول‌های Th1 CD4+ و سلول‌های T سیتوتوکسیک CD8+ در موش متمایل کنند (۹۱، ۱۲۱). الیگونوکلئوتیدهای مشتق از ژنگان ناقص ویروسی با امولسیون Adda Vax نیز هم افزایی می‌کند و با سازوکارهایی که به اینترفرون های نوع یک وابسته است، توانایی آن را در پیش برد مصونیت نوع یک افزایش می‌دهد (۱۲۱). به ویژه، یک واکسن آنفلونزا با ذره ناقص مداخله گر، از طریق تحریک تولید اینترفرون نوع یک، باعث ایجاد مصونیت در مقابل یک ویروس نامرتبط شده است (۱۲۲). این مشاهده پیشنهاد می‌کند که ذرات ناقص مداخله گر می‌توانند به عنوان پاد ویروس‌های پیشگیری کننده یا درمانی مورد استفاده قرار گیرند.

ژنگان‌های ناقص ویروسی در واکسن‌های زنده تضعیف شده علیه ویروس‌های فلج اطفال، سرخک و آنفلونزا حضور دارند (۷۶، ۱۲۶–۱۲۳). اما اثر آن‌ها بر ایجاد مصونیت محافظتی و اثر بخشی واکسن به طور جدی ارزیابی نشده است. با توجه به توانایی ژنگانهای ناقص ویروسی در مداخله گری و تحریک سیستم ایمنی، گمان می‌رود آن‌ها بتوانند در حالی که با کاهش تکثیر و انتشار ویروس، خطر آن را کاهش می‌دهند، کارایی واکسن را افزایش دهند. اگر این تصور درست باشد، تنظیم دقیق مقدار ژنگانهای ناقص ویروسی در تهیه واکسن برای اجتناب از مداخله کامل و کاهش شدید ویروس تا مرحله عدم کارایی مهم است.

تأثیر بر تکامل و پویایی ویروس

در حالی که داده‌های جدید حاصل از توالی یابی نسل بعد حاکی از ظهور صدها ژنگان ناقص ویروسی در هر عفونت ویروسی است، این حقیقت که یک زیر مجموعه کوچک‌تر از ژنگانهای ناقص ویروسی غالب است و مکرراً در نمونه‌های متفاوت تشخیص داده می‌شود (۵۰) نشان می‌دهد که فعالیت‌های پیچیده‌ای در جمعیت ویروسی در جریان هستند.این پیچیدگی‌ها شامل رقابت (و احتمالاً جبران یا همکاری) بین ژنگانهای ناقص ویروسی متفاوت و انتخاب بهترین رقیب‌هایی می‌شود که در مقایسه با ویروس والدی نوع وحشی و ژنگانهای ناقص ویروسی دیگر نسبتاً سازگارتر هستند. ویژگی‌هایی چون قابلیت همانند سازی، بسته بندی، تنظیم سیستم ایمنی وغیره پویایی ویروس را معین می‌کنند. تاکید این نکته حائز اهمیت است که اغلب رویدادهایی که به تشکیل ژنگان ناقص ویروسی منجر می‌شود مانند جهش‌ها، حذف‌ها، نوترکیبی و جابجایی‌ها یا نازیست پذیر و یا برای ویروس مضر هستند. به علاوه، گرچه صدها یا حتی هزاران ژنگان ناقص ویروسی متفاوت طی یک عفونت ویروسی تولید می‌شود، عمده آن‌ها طی تنگناهای[1] جمعیتی که در زیوه رخ می‌دهد، به عنوان مثال هنگام عبور از موانع آناتومیکی یا طی انتقال از یک میزبان به میزبان دیگر، حذف می‌شوند (۱۲۷). اما مواردی وجود دارد که در آن‌ها این ژنگان‌ها می‌توانند از تنگناها عبور کنند؛ مثلاً زمانی که ویروس‌ها میزبان‌هایی را آلوده می‌کنند که سیستم ایمنی سرکوب شده دارند یا میزبان‌هایی که همزمان به چند بیماری مبتلا هستند، این موارد جمعیت‌های بنیان گذار را افزایش می‌دهند. به علاوه، عفونت ممکن است با ویریون‌هایی اتفاق بیافتد که ژنگانهای نوع وحشی و ژنگانهای ناقص

[1] bottleneck

ویروس را باهم بسته بندی کرده‌اند (۱۲۸) و یا مانند ویروس استوماتیت وزیکولی و ویروس فلج اطفالی، ویریون‌ها ممکن است طی عفونت تجمع یابند و بهتر با هم منتقل شوند (۱۲۹، ۱۳۰). مدل‌های ریاضی کنونی تنها ژنگان ناقص ویروسی غالب را در نظر گرفته‌اند (۱۳۱، ۱۳۲)، پیشرفت‌های بیشتری لازم است تا همکاری بالقوه و رقابت بین ژنگانهای ناقص ویروسی در مدل‌ها گنجانده شود.

در حالی که به صورت تاریخی ژنگانهای ناقص ویروسی آشغال‌های همانند سازی، یک محصول مصنوعی در شرایط پاساژ کشت سلولی یا یک مزاحمت در آزمایش‌های آزمایشگاهی محسوب می‌شدند، توجه دوباره به این بخش از جمعیت ویروسی می‌تواند اهمیت زیستی و یا عملکردی آن‌ها را آشکار کند. آیا ژنگانهای ناقص ویروسی به دلیل خاصی وجود دارند؟ چرا اشغال‌ها حفظ می‌شوند؟ با توجه به نرخ بسیار بالای نوترکیبی و نوآرایی برخی ویروس‌ها، ممکن است برای ویروس‌هایی که دستخوش نوترکیبی می‌شوند، ژنگان‌های ناقص ویروسی منبعی از جهش فراهم کنند که برای کمک به سازگاری، به جمعیت زیستای ویروس بازخورد می‌دهد. اینکه آیا ژنگانهای ناقص ویروسی می‌توانند یک مزیت انتخابی برای ویروس باشند و اینکه آیا تعدد عفونت بالا و یا شرایط عفونت همزمان و موضعی در عفونت‌های طبیعی نیز رخی می‌دهد یا خیر، هنوز روشن نشده است.

تحقیقات جدید در حشرات پیشنهاد می‌کنند که ژنگانهای ناقص ویروسی، الگوهای ترجیحی برای تولید DNA ویروسی از ویروس‌های RNA دار، سوبستراهای بیشتری برای کمک به تقویت پاسخ مداخله RNA (مسئول ماندگاری ویروس در حشرات) فراهم می‌کند (۱۰۳). در واقع، نشان داده شده است که تغییر در مقدار DNA ویروسی تولید شده هنگام عفونت با ویروس RNA دار در *دروزوفیلا*، ماندگاری و سینتیک عفونت با ویروس RNA دار وحشی را تغییر می‌دهد. نویسندگان پیشنهاد کردند که تکامل احتمالاً تولید ژنگانهای ناقص ویروسی را به دقت تنظیم کرده است تا عفونت با نوع وحشی را متعادل و به ماندگاری (و در نهایت، انتقال ویروس‌ها) کمک کند.

به علاوه، بررسی دقیق‌تر پویایی ژنگان ناقص ویروسی در جمعیت‌های ویروسی می‌تواند به درک بهتر زیست شناسی ویروس‌های استاندارد کمک کند. در واقع، علاوه بر تمایز قائل شدن بین توالی‌های نوکلئوتیدی، پروتئین‌ها و ساختارهای RNA ضروری و غیر ضروری، ما می‌توانیم اجزای ویروسی را که به صورت سیس و یا ترانس عمل می‌کنند، شناسایی کنیم. یک مطالعه جدید درباره ژنگانهای ناقص ویروس هپاتیت C، به عنوان مثال، ساختارهای RNA جدیدی را شناسایی کرده است که به صورت سیس عمل می‌کنند و برای همانند سازی و بسته بندی لازم هستند (۱۳۳).

نتیجه گیری

فناوری‌های نوظهوری که امکان شناسایی ویروس‌های ناقص و استاندارد را در عفونت‌های طبیعی فراهم می‌کنند و نیز فناوری‌هایی که اجازه می‌دهند بین ژنگانهای ناقص ویروسی و پیامدهای عملکردی ارتباط برقرار کرد، نقش مهمی در احیای توجه به مطالعه ژنگانهای ناقص ویروسی ایفا کرده‌اند. مطالعات جدید ارزیابی تازه‌ای از تنوع ژنگانهای ناقص ویروسی و نقش بالقوه مهم آن‌ها در تعیین پیامد بالینی عفونت‌ها به دست داده‌اند؛ اما تعدادی سؤال همچنان بی پاسخ مانده‌اند: چه سازوکارهای مولکولی تولید ژنگانهای ناقص ویروسی را پیش می‌برند؟ آیا ژنگانهای ناقص ویروسی می‌توانند برای کنترل بیماری زایی و انتشار ویروس مهار شوند؟ تغییرات در جمعیت ژنگانهای ناقص ویروسی چگونه بر تکامل ویروس و سازش با میزبان‌های جدید اثر می‌گذارد؟ عوامل میزبان چگونه بر تجمع و فعالیت ژنگانهای ناقص ویروسی اثر می‌گذارند؟ پاسخگویی به این سؤالات مستلزم توسعه بیشتر فناوری و پژوهش‌های بین رشته‌ای است.

این مقاله ترجمه‌ای است از :

Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences, Richard E Randall and Diane E Griffin, Current Opinion in Virology 2017, 23:35–42

منابع

لطفاً برای دسترسی به منابع به وبسایت مجله به آدرس https://www.ijbio.ir مراجعه کنید.